Zəfəranın (*Crocus sativus* L.) *in vitro* Çoxaldılması

T.H. Qaragözov, M.H.Məmmədova, İ.V.Əzizov, S.Ş. Əsədova

AMEA Botanika İnstitutu, Badamdar şossesi, 40, Bakı AZ1073, Azərbaycan; E-mail:biotexnoloqaz@mail.ru

Crocus sativus L. bitkisinin morfogenez və orqanognez proseslərinə bir sıra amillərin təsiri tədqiq olunmuşdur. Temperatur qradientindən istifadə etməklə in vitro şəraitində de novo 10-dan 25-ə qədər mikrosoğanaqlar alınmışdır.

Açar sözlər: *zəfəran, in vitro morfogenez və orqanogenez, soğanaqlar*

GİRİŞ

Zəfəran (*Crocus sativus* L.) hələ qədim dövrlərdən çox qiymətli dərman bitkisi kimi tanınmış və ondan xalq təbabətində geniş istifadə edilmişdir. Son illərdə zəfərana olan tələbat get-gedə artmışdır ki, bu da onun dişicik tellərindən alınmış preparatların insan orqanizmində əmələ gələn zərərli radikallara və bədxassəli şişlərə qarşı olan fəallığı ilə bağlıdır.

Dünyada zəfəranın gül məhsuluna getdikcə artan tələbat, onun yeni intensiv çoxaldılma üsullarının işlənib hazırlanması zərurətini qarşıya qoyur. Biotexnoloji tədqiqatların əsas məqsədi həm meristem kulturasından sırf mikroklonal çoxaldılmanın, həm də kallus hüceyrələrindən somatik morfogenezin induksiyası yollarının işlənilib hazırlanmasından ibarətdir. Bununla yanaşı, zəfəranın biotexnoloji çoxaldılması zamanı əldə edilən nəticələr gələcəkdə molekulyar-genetik səviyyədə aparılan tədqiqatlarda istifadə edilərək, bu bitkinin faydalı əlamətlərinin inkişafını arzu olunan istiqamətdə həyata keçirməyə imkan yaradacaq.

Zəfəranın hüceyrə biotexnologiyasının öz tarixi və bir sıra uğurları vardır (Fernández, 2004; Fernández, 2007). Hal-hazırda əsas səylər bu bitkinin *in vitro* şəraitində çoxaldılmasının effektivliyinin artırılmasına və bu istiqamətdə aparılan tədqiqatlarda yeni yanaşma yollarının axtarışına yönəlmişdir.

Zəfəran bitkisi üçün morfogenezin induksiyası kimi adi metodoloji problemlərdən başqa, spesifik incəliklər də mövcuddur ki, onlar nəzərə alınmasa in vitro şəraitində alınmış nəticələrin ehtimalı və sabitliyi müəyyən dərəcədə problemli ola bilər .

Çoxaldılma əmsalının artırılması ilə bağlı ən effektiv yanaşmaların axtarışı bu geofit bitkinin təbii şəraitdə ontogenetik inkişafda keçdiyi mərhələləri nəzərə almalıdır. Fenoloji müşahidələr göstərir ki, bu bitki 4 inkişaf mərhələsini keçir. Molekulyar tədqiqatların nəticələrinə əsaslansaq, inkişaf mərhələlərin sayı 6-dan da çoxdur (Zubor et al., 2003).

Çiçəklənmənin qısa müddətli olmasına baxmayaraq, çiçəklənmədən əvvəlki, çiçəklənmə zamanı və çiçəklənmədən sonraki inkişaf fazalarını ayrı inkişaf mərhələləri kimi qəbul etmək lazımdır. Bu dövrlər eyni substratlar üçün rəqabət aparan müxtəlif tənzimlənmə sistemlərinin aktivləşməsi ilə bağlı hormonal balansının dəyişikliyi ilə müşayiət olunurlar ki, bu in vitro tədqiqatlarda hüceyrə və toxumaların kallus və morfogenez induktorlarına kompetentliyində özünü biruzə verir. Çiçəklənməni istisna etməklə, bu proseslərin davam etmə müddəti və mexanizmi hazırda məlum deyildir.

Crocus sativus L. bitkisinin praktiki olaraq sükünət dövrü yoxdur və ontogenezin hər sonrakı mərhələsi əvvəlki mərhələnin davamı kimi özünü biruzə verir. Mərhələlərinin çoxalmış sayını bir çox hallarda bu növün əsrlərlə yayılma ərazilərinin iqlim şəraitlərinə uyğunlaşan ekotipik xüsusiyyətləri ilə izah etmək olar.

Crocus sativus L. bitkisinin biotexnoloji çoxaldılmasında bir çox problemlər mövcuddur ki, bu da bitkinin bioloji xüsusiyyətlərinin kifayət qədər öyrənilməməsi ilə bağlıdır. Biokimya və molekulyar biologiyanın müasir metodlarının tədbiq edilməsi embriogenez və morfogenezin hormonal tənziminin incə mexanizmlərinin müəyyən edilməsinə və *Crocus sativus* L. bitkisinin hüceyrə çoxaldılması texnologiyalarının daha da uğurla həyata keçirilməsinə imkan verəcəkdir.

MATERİAL VƏ METODLAR

İlkin material kimi *Crocus sativus L.* bitkisinin Abşeron populyasiyasının soğanaqlarından istifadə edilmişdir.

Təcrübələrin aparılması üçün istifadə edilən soğanaqların hazırlıq mərhələləri bizim əvvəl çap olunan məqaləmizdə tam açıqlanmışdır (Карагезов и др., 2010 a).

Soğanaqların hibberellin turşusu ilə (QA_3) işlənməsi hibberellinin 50-100 mq/l su məhlullarında

24 saat ərzində inkubasiya etmə metodu əsasında aparılmışdır. Nəzarət soğanaqları steril distillə suda inkubasiya edilmişdir. Köndələninə diskvari laylara kəsilmiş soğanaqların hissələri müxtəlif hormon induktoru tərkibli qida mühitlərinə əkilmişdir. Soğanaqların yuxarı, orta və aşağı hissələrindən kəsilmiş disklərin hər biri ayrı-ayrı sınaq şüşəsində əkilmişdir.

Disklərdə kallus hüceyrələrin əmələ gəlməsindən sonra nümunələr aşağı müsbət (+ 5^0) temperatur şəraitində 5 həftə ərzində inkubasiya edilmişdir. İnkubasiya sona çatdıqda nümunələr yenə də in vitro şəraitinin adi parametləri əsasında kultivasiya edilmişdir (Карагезов и др., 2010 a).

NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

Aparılmış tədqiqatlar göstərmişdir ki, istifadə edilmiş təcrübə sxemində soğanaqların de novo əmələ gəlməsinin ən yüksək induksiyası 6-benzilaminopurin (BAP) və 1-naftilsirkə turşusu (NST) və BAP, 2.4-dixlorfenoksisirkə turşusu (2.4-D) və 6-furfurilaminopurin (kinetin) tərkibli qida mühitlərində aşkar olunmuşdur. Ən effektiv orqanogenez isə BAP və NST istifadə etməklə soğanaqların orta və aşağı hissələrindən alınmış kəsiklərdə müşahidə edilmişdir. Orta hissələrdən alınmış kəsiklərdə yüksək effekt BAP və NST 1/10, aşağı effekt isə 1/8 nisbətində alınmışdır. BAP və NST 1/8 nisbətinin ən zəif təsiri mühitdə saxarozanın qatılığı 3 dəfə artıq olan zaman qeyd edilmişdir.

Hibberellinin embriogenez və morfogenezə müsbət təsiri yalnız BAP, 2.4-D və kinetinin birgə istifadəsi zamanı müşahidə olunmuşdur. Hibberellinin stimuledici təsirinin maksimum qiyməti soğanaqların orta hissələrindən alınmış kəsiklərdə qeyd edilmişdir.

Tədqiqatlar göstərmişdir ki, kallus kulturasının və morfogenezin alınmasında ilkin material kimi istifadə olunan soğanaqların ontogenezin hansı mərhələsində olduğunun dəqiq təyin edilməsi çətindir. Bu da ilin hər fəslinin iqlim parametrlərinin qeyri-stabil olması və uyğun gəlməməsi ilə bağlıdır.

Nəzərə alsaq ki, *Crocus sativus* L. bitkisinin ontogenetik inkişaf proqramının fəaliyyətini müəyyən edən ətraf mühitin göstəriciləri ildən ilə dəyişir, in vitro effektlərinin həyata keçməsinə zəmanət verən yeganə yol - ilkin materialın süni iqlim şəraitdə becərilməsi vasitəsilə ontogenez mərhələlərinin standart və ardıcıl modelləşdirilməsidir. Yalnız bu cür alınmış ilkin material biotexnoloji tədqiqatlarda istifadə edilə bilər.

Bundan başqa, *in vitro* morfogenetik proseslərə və bu səbəbdən təcrid edilmiş kulturada çoxaldılma əmsalının effektliyinə əhəmiyyətli dərəcədə təsir edə bilən bir sıra amillər də mövcuddur. Buna misal selenin torpaqda miqdarını və onun bitkilərdə müəyyən dərəcədə toplanmasını qeyd etmək lazımdır (Карагезов и др., 2010 b).

Çiçəklənmədən sonra soğanaqlar bitki hüceyrələrinin bölünməsi prosesində inhibitor rolunu oynayan selen tərkibli birləşmələrdən əhəmiyyətli dərəcədə azad olunurlar.

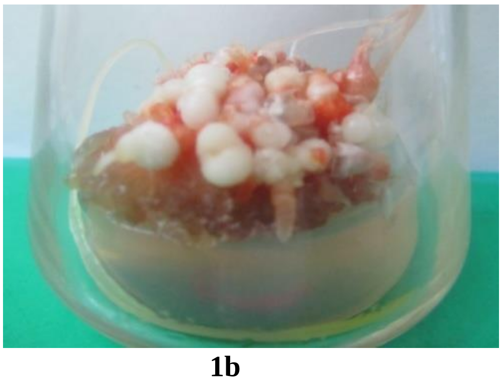
Crocus sativus L. soğanaqlarının bir fəsil ərzində süni substratlarda becərilməsi ilkin toxumaların *in vitro* şəraitində hormon induktorlarına kompetentliyinin əhəmiyyətli dərəcədə artırmasına imkan yaratmışdır.

Digər vacib şərtlərdən biri də bu növün hibberellin kimi *in vivo* hormonal amilinə olan kompetentliyidir. Təbiətdə aşağı temperatur şəraitində bitkilərdə həyat fəaliyyətini təmin edən proseslərin gedişi zamanı hibberellin və hibberellin tərkibli birləşmələr sərbəst formaya keçdiyindən, morfofizioloji proseslərin gedişinə əhəmiyyətli dərəcədə təsir göstərirlər.

Ekzogen hibberellinin miqdarının artması çiçək tumurcuqlarının əhəmiyyətli dərəcədə çoxalmasına səbəb ola bilər (Азизбекова и др., 1978). Müasir dövrdə qida mühitlərinin tərkibində hibberellin turşusunun əlavə edilməsi in vitro şəraitində soğanaqların *de novo* əmələ gəlməsinin effektivliyini artırmaq üçün istifadə oluna bilən yanaşmalardan biridir.



1a



1b

Şəkil 1. Embriogenezin (1a) və morfogenezin (1b) ilkin ardıcıl mərhələləri.

Lakin təcrid olunmuş kulturada auksin və sitokininlərin müəyyən nisbətləri fonunda bir sıra hallarda ekzogen hibberellin orqanogenez prosesinin gedişi üçün nəinki qeyri-effektli, hətta mənfi təsirli ola bilər. Bunu da ilkin materialda endogen hibberellinin və yaxud hiberellin tərkibli birləşmələrin yüksək miqdarı və *in vitro* kulturasında müxtəlif amillərin mürəkkəb qarşılıqlı əlagələri ilə izah etmək olar.



2a



2b

Şəkil 2. in vitro kulturada *Crocus sativus L.* mikrosoğanaqların əmələ gəlməsi.

In vitro şəraitində orqanogenezin effektliyinə təsir göstərən yuxarıda qeyd edilən bütün amillərin, o cümlədən, ədəbiyyatda bu vaxtda gədər açıqlanmamış temperatur qradientlərinin istifadəsi, bizə orqanogenez mərhələsində induksiya edilmiş morfogenezi həyata keçirməyə və de novo soğanaqların alınmasına imkan yaratdı.

Qida mühitlərinin variantlarından və hormon amillərinin kombinasiyalarından asılı olaraq bir sınaq şüşəsində 10-dan 25-ə qədər soğanaq əmələ gəlmişdir (Şək. 1, 2).

Beləliklə, aparılmış tədqiqatlar göstərmişdir ki, *Crocus sativus* L. bitkisinin *in vitro* embriogenez, morfogenez və orqanogenez prosesləri zamanı hormonal amillərin arasında müxtəlif qarşılıqlı əlagələr yaranır. İlkin eksplantın tipindən asılı olaraq, *Crocus sativus* L. üçün hormon təbiətli induktorların təsir effekti özünü fərqli olaraq biruzə verir.

MINNƏTDARLIQ

Bu iş Azərbaycan Respublikasının Prezidenti yanında Elmin İnkişafı Fondunun maliyyə yardımı ilə yerinə yetirilmişdir – Qrant № EİF-2011-1(3)-82/49/3.

ƏDƏBİYYAT

Азизбекова Н.Ш., Миляева Э.Л., Лобова Н.В. (1978) Влияние гиббереллина и кинетина на формирование цветочных органов шафрана. Физиология растений, **25(**3): 603-609.

Карагезов Т.Г., Асадова С.Ш., Мамедова М.Г. (2010 a) Каллусогенез и соматический эмбриогенез у *Crocus sativus* L. AMEA-nın Xəbərləri (Biologiya elmləri), **65(**1-2): 52-57.

Карагезов Т.Г., Мамедова М.Г., Азизов И.В., Асадова С.Ш. (2010 b) Особенности каллусообразования и регенерации растений шафрана (*Crocus sativus* L). Мат. Межд. конференции с элементами научной школы для молодежи, 22-25 сентября 2010 г., Мичуринск, 163-167.

Fernández J.A. (2004) Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. Recent Research in Developmental Plant Science **2**: 127–159.

Fernandez, J.A. (2007) Genetic resources of saffron and allies (Crocus spp.). Acta Horticulturae **739:** 167–185

Zubor A.A., Surányi G., Györi Z., Borbėly G., Prokisch J. (2004) Molecular biological approach of the systematics of *Crocus sativus* L.and its allies. In: Proceedings of the First International Symposium on Saffron Biology and Biotechnology (Abdullayev F., ed.), 85-93.

Размножение Шафрана (*Crocus sativus* L) *in itro*

Т.Г.Карагезов, М.Г.Мамедова, И.В. Азизов, С.Ш.Асадова

Институт ботаники НАНА

Изучен ряд факторов, влияющих на морфогенез и органогенез шафрана (*Crocus sativus* L). С использованием температурного градиента в условиях *in vitro de novo* получено от 10 до 25 микролуковиц.

***Ключевые слова**: шафран, in vitro морфогенез и органогенез, клубнелуковицы*

Propagation of Saffron (*Crocus sativus* L) *in vitro*

T.G.Karagyozov, M.G.Mamedova, I.V.Azizov, S.Sh.Asadova

Institute of Botany, ANAS

Factors influencing on morphogenesis and organogenesis of saffron (*Crocus sativus* L.) have been studied. Using temperature gradient *in vitro* 10 - 25 microcorms were obtained *de novo*.

***Key words:** saffron, in vitro morphogenesis, organogenesis, corms*